



УДК 547.953.07

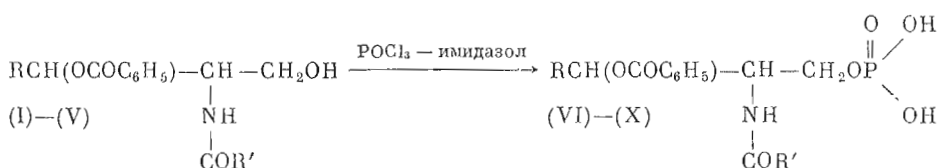
ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ 3-БЕНЗОИЛЦЕРАМИДОВ ХЛОРОКИСЬЮ ФОСФОРА В ПРИСУТСТВИИ ИМИДАЗОЛА

*Карпышев Н. Н., Бушнев А. С., Звонкова Е. Н.,
Евстигнева Р. П.*

*Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова*

Предложен новый метод получения 3-бензоилцерамидфосфатов из 3-бензоилцерамидов фосфорилированием последних хлорокисью фосфора в присутствии имидазола, отличающийся от известных ранее одностадийностью и большей доступностью фосфорилирующего агента. При помощи спектроскопии ^{31}P -ЯМР исследовано строение фосфорилирующих агентов, образующихся в реакционной смеси при различных соотношениях хлорокиси фосфора и имидазола.

В нашей лаборатории 3-бензоилцерамидфосфаты использованы при синтезе ряда сфингофосфолипидов: N,N-диметильного предшественника сфингомиелина, церамидфосфоглицерина, церамидфосфоаминопропандиола, сфингоэтаноламина (см. ссылки к работе [1]), церамидфосфосерина [2]. Кроме того, 3-бензоилцерамидфосфаты являются исходными соединениями при синтезе церамидфосфатов — возможных метаболитов сфингофосфолипидов [1]. Наиболее удобным в препаративном отношении методом получения 3-бензоилцерамидфосфатов следует считать фосфорилирование 3-бензоилцерамидов монозамещенными фосфодихлоридами, преимущество которых перед хлорокисью фосфора заключается в практическом отсутствии побочных реакций. Однако при этом необходимо отдельное получение фосфорилирующего агента и дополнительная стадия удаления защиты при фосфатной группе [1, 3]. В то же время в химии нуклеотидов разработан ряд методов получения фосфатов в одну стадию фосфорилированием спиртов хлорокисью фосфора в присутствии различных модифицирующих добавок, таких, как имидазол [4], триалкилфосфаты, водный ацетонитрил и др. [5]. В связи с этим для фосфорилирования 3-бензоилцерамидов (I) — (V) с целью получения фосфатов (VI) — (X) нами использована хлорокись фосфора в присутствии имидазола (см. таблицу). Данный метод, предложенный ранее для фосфорилирования 3'-концевых гидроксильных групп защищенных олигонуклеотидов [4], привлекателен вследствие доступности реагентов и простоты экспериментального выполнения.

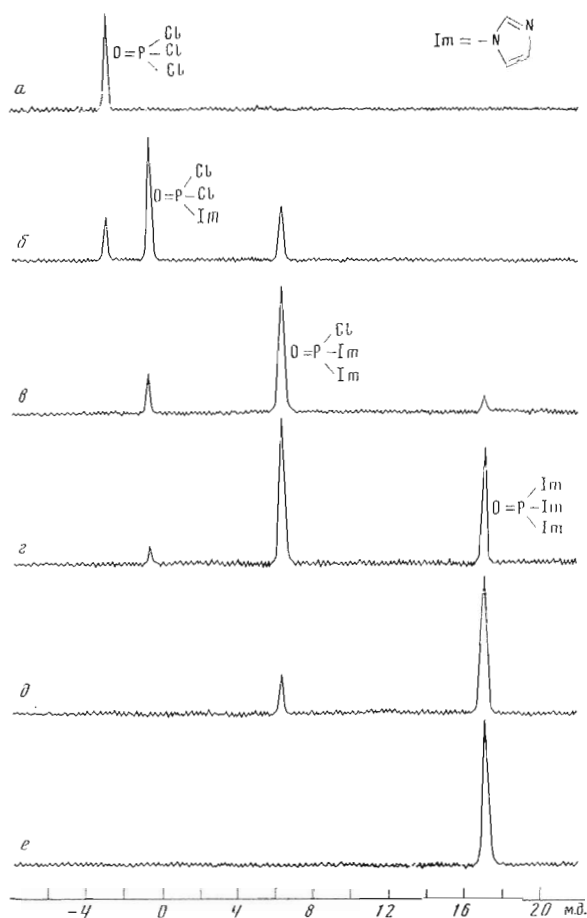


Характеристики 3-бензоилцерамид-1-фосфатов, полученных фосфорилированием хлороксиэфирами фосфора в присутствии имидзола
 $[RCH(OOC_6H_5)_2-CH(NHCO_6H_5)-CH_2OP(O)(OH)_2]$

| Номер | 3-Бензоилцерамид | | | 3-Бензоилцерамид-1-фосфат | | | | |
|-------|--------------------------------------|--|--------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | R | R' | Конфигурация | Номер | Аммониевая соль | | Свободная кислота | |
| | | | | | Выход, % | Т. пл., °С (растворитель) | Т. пл., °С (растворитель) | Лит. данные, Т. пл., °С [1] |
| (I) | C ₁₅ H ₃₁ - | C ₁₇ H ₃₃ - | <i>D,L</i> -эритро | (VI) | 75 | 136-138 (х-м) * | 72-74 (х-м) | 72-74 |
| (II) | C ₁₅ H ₃₁ - | C ₁₇ H ₃₃ - | <i>D</i> -эритро | (VII)** | 72 | 134-137 (а) | 83-84 (х-м) | 83-83,5 |
| (III) | C ₁₅ H ₃₁ - | C ₁₇ H ₃₃ - | <i>D,L</i> -трео | (VIII) | 71 | 71-74 (э) | 58-60 (а) | 58-60 |
| (IV) | C ₁₃ H ₂₇ C=CH | C ₁₇ H ₃₃ - | <i>D,L</i> -эритро | (IX) | 69 | 123-125 (х-а) | 69-70 (л-а) | 69-70 |
| (V) | C ₁₅ H ₃₁ - | C ₆ H ₅ CH ₂ O- | <i>D,L</i> -эритро | (X)*** | 69 | 114-118 (д-а) | 63-65 (а) | - |

* Буквами обозначены растворители: х — хлороформ, м — метанол, а — ацетон, э — этилацетат, л — лигитоловый эфир.
 ** ДОВ₁(αT₉λ, км) (с 1; хлороформ — метанол — 25% NH₄ОН, 15:3:1): -13,0 (589), -12,0 (579), -6,5 (436), -5,0 (407), 0 (366), +6,5 (334), +12,5 (312), +16,0 (302).

*** ИК-спектр, см⁻¹: 3325 ср, 3280 с, 1710 с, 1700 с, 1650 с, 1270 с, 1180 с, 1160 с, 960 ср. Элементный анализ аммониевой соли (X) соответствует расщепленному дин C₃₃H₅₆N₄O₈P.



Спектры ^{31}P -ЯМР смесей POCl_3 — имидазол (моль/моль): *a* — POCl_3 , *b* — 1:1, *в* — 1:2, *г* — 1:3, *д* — 1:4, *е* — 1:6. Спектры сняты в смеси хлороформ — пиридин при концентрации ^{31}P 0,4 М и мольном соотношении ^{31}P -пиридин 1:4

Обработка методики эксперимента осуществлялась на примере 3-бензоил-2-стеароил-*гас*-сфинганина (I), который фосфорилировали при различных мольных соотношениях POCl_3 — имидазол в разработанных ранее в нашей лаборатории стандартных для фосфорилирования 3-бензоилцерамидов условиях [3]: при пониженной температуре и избытке фосфорилирующего агента с использованием в качестве растворителя смеси хлороформ — пиридин. При этом найдено, что для получения 3-бензоилцерамидфосфата (VI) реакционную массу следует разлагать быстрым добавлением избытка концентрированной соляной кислоты, чем достигается достаточно быстрый гидролиз промежуточного соединения и предотвращение дальнейших реакций. При мольном соотношении POCl_3 — имидазол 1:1, использованном ранее в работе [4], наряду с целевым соединением (VI) образуется в количестве до 10% на исходный 3-бензоилцерамид (I) побочное соединение — ди(3-бензоилцерамид-1)-фосфат (согласно данным ИК-спектроскопии и элементного анализа) при общем выходе продуктов фосфорилирования ~70%. Такой факт неизбирательного фосфорилирования позволяет предположить присутствие остаточной хлорокиси фосфора в реакционной смеси. С целью нахождения оптимального со-

отношения POCl_3 — имидазол было предпринято исследование при помощи спектроскопии ^{31}P -ЯМР состава смесей, образующихся при различных соотношениях данных реагентов в смеси хлороформ — пиридин, при использовании того же мольного соотношения хлорокись фосфора — пиридин, что и при фосфорилировании 3-бензоилцерамида (I) (см. рисунок).

Состав фосфорилирующих смесей, образующихся при различных соотношениях хлорокись фосфора и имидазола в чистом пиридине, был исследован ранее [6]. Однако наши собственные результаты несколько отличаются от результатов данной работы [6]. Это обусловлено тем, что при соизмеримых концентрациях пиридина и имидазола, которые имеются в нашем случае, акцептором HCl служит преимущественно имидазол, являющийся более сильным основанием ($\text{p}K_a$ пиридина и имидазола в водном растворе составляют соответственно 5,23 и 7,03).

Раствор POCl_3 в смеси хлороформ — пиридин дает сигнал около $-3,5$ м.д. (рисунок). В смеси хлорокись фосфора — имидазол, 1:1 (б), в том же растворителе наряду с сигналами при $-0,8$ и $+6,3$ м.д., отнесенными в результате логического анализа совокупности спектров (а—е) и по аналогии с данными работы [6] к имидазолфосфодихлориду и димидазолилфосфохлориду, имеется и сигнал хлорокиси фосфора. В смесях POCl_3 — имидазол, 1:2 (в) и 1:3 (г), наряду с сигналами, принадлежащими моно- и димидазолному производному, имеется и сигнал при 17,0 м.д., приписанный триимидазолилфосфиноксиду. При соотношении 1:4 (д) сигнал при 17,0 м.д. является преобладающим, а при соотношении 1:6 (е) — единственным. Этот сигнал по химическому сдвигу совпадает с сигналом триимидазолилфосфиноксида, специально синтезированного нами по методу, приводимому в литературе [7]. Раствор триимидазолилфосфиноксида (е) в смеси хлороформ — пиридин совершенно не фосфорилировал 3-бензоилцерамид (I) в наших стандартных условиях, что позволяет сделать вывод о сравнительной устойчивости связи $\text{P}-\text{N}$ к атаке нуклеофилом (I) по сравнению со связью $\text{P}-\text{Cl}$. Этот вывод согласуется с данными работы [6], в которой отмечено, что триимидазолилфосфиноксид является менее активным фосфорилирующим агентом, чем моно- и димидазолные производные хлорокиси фосфора. Фосфорилирование 3-бензоилцерамида (I) смесями (в) и (г) дало практически одинаковые ($\sim 75\%$) выходы целевого фосфата (VI), поэтому в дальнейшем применяли исключительно смесь (в), основным фосфорилирующим агентом которой является димидазолилфосфохлорид. С использованием этой смеси на основе 3-бензоилцерамидов (I—V) получен ряд 3-бензоилцерамид-1-фосфатов (VI—X), которые выделялись в виде аммониевых солей высаживанием из эфирного раствора ацетоном, содержащим аммиак, и, как правило, не требовали дальнейшей хроматографической очистки. Аммониевые соли фосфатов (VI) — (X) были также обработкой даэксом 50W в H^+ -форме переведены в свободные кислоты, которые по спектральным характеристикам, температуре плавления и хроматографической подвижности соответствовали аналогичным соединениям, полученным ранее другим методом [1].

Выходы полученных нами 3-бензоилцерамидфосфатов (VI) — (X) лежат в пределах 69—75% (см. таблицу), что сравнимо с суммарными выходами этих же фосфатов, синтезированных фосфорилированием 3-бензоилцерамидов β, β', β'' -трихлорэтилфосфодихлоридом с последующим удалением трихлорэтильной защиты [1], но данный метод проще (1 стадия), а фосфорилирующий агент доступнее [8].

Экспериментальная часть

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре WP-60 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC 28 (Bruker-Physic AG, ФРГ) на частоте 24,28 МГц в смеси хлороформ — пиридин, при концентрации ^{31}P 0,4 М и

мольном соотношении ^{31}P — пиридин 1:4; спектры записаны с широкополосным гетероядерным подавлением спин-спинового взаимодействия ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$; сдвиги приведены относительно H_3PO_4 как внешнего стандарта. Данные ДОВ определяли на поляриметре Perkin-Elmer 241 C (Англия). ИК-спектры снимали на приборе Perkin-Elmer 257 (Англия) в таблетках с КВг. Хроматографический контроль осуществляли на пластинках Silufol (ЧССР) в системе хлороформ — метанол — 25% NH_4OH (15:5:1), обнаружение — сернокислым раствором молибдата аммония.

Фосфорилирование 3-бензоилцерамидов. К раствору 1,3 мл (14 ммоль) хлорокси фосфора в 5 мл пиридина при 0°C прибавляли по каплям за 30 мин раствор 2,3 г (28 ммоль) имидазола в 60 мл хлороформа. Перемешивали 1 ч при 20°C , охлаждали до -25°C , прибавляли за 30 мин раствор 2,3 ммоль 3-бензоилцерамида (I) — (V) в 60 мл хлороформа и перемешивали при этой температуре еще 30 мин. Охлаждение прекращали, быстро добавляли 20 мл концентрированной соляной кислоты и перемешивали 2 ч при 20°C . Органический слой отделяли, разбавляли 350 мл эфира, промывали водой, упаривали. Остаток растворяли в 2–5 мл эфира и добавляли смесь 30 мл ацетона и 1 мл 25% NH_4OH . Выпавший осадок аммониевой соли фосфата (VI–X) немедленно отделяли и сушили.

Авторы благодарны И. А. Василенко за снятие спектров ^{31}P -ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бушнев А. С., Карпышев Н. Н., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1979) Биоорганическая химия, 5, 1381–1384.
2. Карпышев Н. Н., Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1979) Биоорганическая химия, 5, 1422–1423.
3. Звонкова Е. Н., Бушнев А. С., Мицнер В. И., Евстигнеева Р. П. (1973) Ж. орган. химии, 9, 31–35.
4. Бакапова В. А., Сергеева Н. Ф., Джапаридзе Н. Ш., Смирнов В. Д., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1975) Биоорганическая химия, 1, 774–778.
5. Slotin L. A. (1977) Synthesis, 737–752.
6. Сергеева Н. Ф., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А., Зарытова В. Ф., Лебедев А. В., Кворре Д. Г. (1976) Биоорганическая химия, 2, 1056–1061.
7. Konieczny M., Sosnovsky G. (1978) Z. Naturforsch., 33b, 1033–1039.
8. Карпышев Н. Н., Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. Авт. свид. СССР № 662554. Бюл. изобр., № 18 (1979).

Поступила в редакцию
12.XI.1979

PHOSPHORYLATION OF 3-BENZOYL CERAMIDES BY PHOSPHORUS OXYCHLORIDE IN THE PRESENCE OF IMIDAZOLE

KARPYSEV N. N., BUSHNEV A. S., ZVONKOVA E. N.,
EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

A new method for preparing 3-benzoylceramide-1-phosphates by phosphorylation of 3-benzoylceramides with phosphorus oxychloride in the presence of imidazole was developed. The structure of phosphorylating agents formed in the reaction mixture at various phosphorus oxychloride — imidazole molar ratios was studied by ^{31}P NMR spectroscopy.